

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許出願公告番号

特公平6-37575

(24)(44)公告日 平成6年(1994)5月18日

(51)Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 8 L 5/08	L A X	7415-4 J		
A 6 1 K 7/00		J 7252-4 C		
		R 7252-4 C		
9/06		D 7329-4 C		
31/00	A G B	9283-4 C		

発明の数2(全10頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平1-232667  
(62)分割の表示 特願昭60-147612の分割  
(22)出願日 昭和60年(1985)7月4日  
  
(65)公開番号 特開平2-138346  
(43)公開日 平成2年(1990)5月28日  
(31)優先権主張番号 678, 895  
(32)優先日 1984年12月6日  
(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 999999999  
バイオマトリックス、インコーポレイテッド  
米国、ニュージャージー 07657、リッジ  
フィールド、レールロード・アベニュー  
65  
(72)発明者 エンドレ エー. ボラズ  
米国、ニュージャージー 07024、エフ・  
ティ. リー、オールドベイリセイド・ロー  
ド 200  
(72)発明者 アドルフ レシナー  
米国、ニュージャージー 07022、フェア  
ビュー、プロスペクト・アベニュー 623  
(74)代理人 弁理士 野河 信太郎

審査官 城所 宏

(54)【発明の名称】 架橋ヒアルロン酸ゲル組成物及び製造法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 繰り返し単位がヒアルロン酸もしくはその塩とジビニルスルホンと反応しうる官能基を有する他の親水性ポリマーの少なくとも1つであり、架橋剤がジビニルスルホンであり、ヒアルロン酸もしくはその塩と親水性ポリマーとの合計濃度が1~8重量%でその中でヒアルロン酸もしくはその塩が5~95重量%であり、かつ20~8000膨潤率を示す混合架橋ヒアルロン酸ゲル組成物。

【請求項2】 他の親水性ポリマーがヒドロキシエチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、キサンテンゴム、コンドロイチン硫酸塩、ヘパリンからなる群から選ばれた天然または合成の多糖類、またはコラーゲン、エラスチン、アルブミン、グロブリン、ケラチン硫酸塩、硫酸アミノグリコサミノグリカンからなる群から選択さ

れる蛋白質、または合成の水溶性ポリマーである特許請求の範囲第1項に記載の組成物。

【請求項3】 不活性な水不溶性物質を、ゲル中の高分子物質と不活性な水不溶性物質との合計した重量の1~95%含有する特許請求の範囲第1項記載の組成物。

【請求項4】 不活性な水不溶性物質が炭化水素、油または脂肪、顔料、ポリエチレンまたはポリテトラフルオロエチレンである特許請求の範囲第3項に記載の組成物。

【請求項5】 炭化水素がワセリン、油または脂肪がみつろう、やし油またはラノリン、顔料がカオリン、酸化第二鉄、または不溶性染料である特許請求の範囲第4項記載の組成物。

【請求項6】 ゲル中の巨大網目分子構造に共有結合する低分子量物質を、高分子物質の重量の1~95重量%含有する特許請求の範囲第1項記載の組成物。

【請求項7】低分子量物質が医薬である特許請求の範囲第6項に記載の組成物。

【請求項8】低分子量物質がカルミン酸である特許請求の範囲第7項記載の組成物。

【請求項9】特許請求の範囲第1項のゲルで形成された分子籠に生物学的もしくは薬学的活性物質が分散されかつ制御された仕方で拡散しうる特許請求の範囲第1項記載の組成物。

【請求項10】ヒアルロン酸またはその塩と、ジビニルスルホンと反応しうる官能基を有する他の親水性ポリマーの少なくとも1つとの混合物を、pH約9以上の希アルカリ水溶液中、約20℃でジビニルスルホンとの架橋反応に付し、ヒアルロン酸と他の親水性ポリマーの混合架橋ゲルからなる反応混合物を得ることを特徴とする、20～8000膨潤率を示す混合架橋ヒアルロン酸ゲル組成物の製造法。

【請求項11】他の親水性ポリマーがヒドロキシエチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、キサンテンゴム、コンドロイチン硫酸塩、ヘパリンからなる群から選ばれた天然または合成の多糖類、またはコラーゲン、エラスチン、アルブミン、グロブリン、ケラチン硫酸塩、硫酸アミノグリコサミノグリカンからなる群から選択される蛋白質、または合成の水溶性ポリマーである特許請求の範囲第10項記載の方法。

【請求項12】ヒアルロン酸またはその塩が、分子量約50,000～ $8 \times 10^6$ である特許請求の範囲第10項に記載の方法。

【請求項13】反応混合物におけるヒアルロン酸またはその塩と前記他の親水性ポリマーとの合計濃度が1～8重量%で、ヒアルロン酸またはその塩が、ヒアルロン酸またはその塩と前記他の親水性ポリマーとの合計量の5～95重量%である特許請求の範囲第10項に記載の方法。

【請求項14】ヒアルロン酸またはその塩とジビニルスルホンとの重量比が15:1～1:5である特許請求の範囲第10項に記載の方法。

【請求項15】反応混合物にさらに塩酸、硫酸、リン酸または酢酸のそれぞれのアルカリ金属塩を、約20重量%になるまで十分に添加することからなる特許請求の範囲第10項に記載の方法。

【請求項16】ヒアルロン酸もしくはその塩とジビニルスルホンと反応しうる官能基を有する他の親水性ポリマーの少なくとも1つとの混合物のpH9以上の希アルカリ水溶液中に、不活性な水不溶性物質を添加し、常温でジビニルスルホンとの架橋反応に付す特許請求の範囲第10項記載の方法。

【請求項17】不活性な水不溶性物質が炭化水素、油または脂肪、顔料、ポリエチレンまたはポリテトラフルオロエチレンである特許請求の範囲第16項に記載の方法。

【請求項18】炭化水素がワセリン、油または脂肪がみつろう、やし油またはラノリン、顔料がカオリン、酸化

第二鉄または不溶性染料である特許請求の範囲の第17項に記載の方法。

【請求項19】ヒアルロン酸もしくはその塩と他の親水性ポリマーとの混合物の濃度が1～8重量%であり、不活性な水不溶性物質が、ヒアルロン酸もしくはその塩とポリマーとに不活性な水不溶性物質とを合計した重量の1～95重量%含まれてなる特許請求の範囲第16項に記載の方法。

【請求項20】ヒアルロン酸もしくはその塩とジビニルスルホンと反応しうる官能基を有する他の親水性ポリマーの少なくとも1つとの混合物のpH約9以上の希アルカリ水溶液中に、ジビニルスルホンに対して反応性の活性水素原子を有する官能基をもつ低分子量物質を加え、約20℃でジビニルスルホンとの架橋反応に付す特許請求の範囲第10項記載の方法。

【請求項21】低分子量物質が医薬である特許請求の範囲第20項に記載の方法。

【請求項22】低分子量物質がカルミン酸である特許請求の範囲第20項に記載の方法。

【請求項23】ヒアルロン酸もしくはその塩と他の親水性ポリマーとの混合物の濃度が1～8重量%であり、低分子量物質が、ヒアルロン酸もしくはその塩とポリマーとに低分子量物質を合計した重量の1～95重量%含まれてなる特許請求の範囲第20項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

(イ) 産業上の利用分野

この発明はヒアルロン酸含有の混合ゲル、またそれを含む配合物及びその製造法に関する。

(ロ) 従来の技術

ヒアルロン酸(HA)はN-アセチル-D-グルコサミンと単糖類のD-グルクロン酸が交互に $\beta$ -1,4結合し、形成された二糖単位がさらに $\beta$ -1,3グリコシド結合した多糖類として天然に存在しよく知られている。HAは通常はそのナトリウム塩の形で存在する。一般にHAの分子量は50,000から $8 \times 10^6$ もしくはさらに高い範囲にある。

従来HAの架橋は、1,2,3,4-ジェポキシブタンのアルカリ溶液で50℃で処理することにより行なわれていた

(T. C. ローラント、K. ヘルジグ及びB. ゲロッタ、アフタ ケミカ スカンディナビカ (Acta Chem. Scand.) 18[1984], No. 1, 274-5)。この方法により得られる製品は水で大きく膨潤するゲルである。またジビニルスルホン(以下DVSとする)も多糖類とわりわけセルロースの架橋剤としてよく知られている。

(米国特許第3,357,784号)。

(ハ) 発明の構成

この発明はヒアルロン酸と他の親水性ポリマーとの混合架橋ゲルを提供するものである。

また他に、この発明は他のいろいろな物質を充填した、ヒアルロン酸と他のポリマーとの架橋ゲルを提供するも

のである。

さらに他に、この発明はゲルの巨大分子構造に共有結合する低分子量物質を含む架橋ヒアルロン酸ゲルを提供するものである。

またさらに他に、この発明は架橋ヒアルロン酸ゲルを含むいろいろな配合物（組成物）を提供するものである。最後に、この発明は、この発明の組成物の製造法を提供するものである。

この発明は、ジビニルスルホン（DVS）が室温すなわち約20℃の温度下でアルカリ水溶液中においてHAと容易に反応してHAの架橋ゲルを与えるという事実に基づいている。ここで使われているHAという語は、ヒアルロン酸及びそのナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウムなどの塩を表わしている。これらのゲルは水または水含有媒体中で膨潤する。膨潤率（swelling ratio）はゲルの架橋度に依存する。発明者等はHAの分子量、その反応混合液中での濃度、アルカリ濃度さらにポリマー／DVSの比などを含むいろいろの要因によって架橋度を制御できる事実を見出した。反応は非常に速く、たいいていの場合開始数分後には強固なゲルが得られる。これらのゲルの膨潤率はその反応条件によるが20～8,000もしくはこれ以上のものである。

HA架橋ゲルの膨潤率は同じ反応条件下で得られる他の多糖類の架橋ゲルの膨潤率よりは十分に大きいことも見い出された。このことは（他の多糖類と比較したときの）HAそれ自身の特性並びにその水溶液特性とによって説明されよう。発明者らは、水中で、大きいHA分子が、その溶液中で著しく大溶積になり、非常に可撓性のある長いランダムコイルを形成することを発見した。例えば、生理食塩水中における水和したHAの比体積は約 $2\sim 6 \times 10^3 \text{ ml/g}$ である。このことは、HAの非常に低濃度の水溶液中では、溶液の物理化学特性ばかりでなく、さらにHAと他の低分子量物質との反応にも十分に影響を与える排除体積効果が生じることを意味している。換言すれば、HA溶液の性質は他の多糖類で観察されるものとは異なって、架橋度や架橋ゲルの挙動に影響を与えるのである。

発明者らはまた次のことも発見した。すなわち高膨潤率のゲルを与えるHAのこの独特の性質は、HAと他の親水性ポリマーとの混合物とで製造される架橋ゲルの性質を改質するのに使用することができるということである。上記親水性ポリマーとは、ヒドロキシセルロース、カルボキシメチルセルロース、キサンテンゴム、コンドロイチン硫酸塩、ヘパリンのような人工または合成の多糖類、コラーゲン、エラスチン、アルブミン、グロブリンなどのようないろんな種類の蛋白質、硫酸ケラチン、硫酸アミノグリコサミノグリカンのような硫酸蛋白質、ポリビニルアルコールやその共重合体、ポリヒドロキシエチルメタクリレートなどのような合成の水溶性ポリマー等である。換言すれば、水またはアルカリ水

溶液に可溶性であり、かつDVSと反応可能な基、すなわち、水酸基、アミノ基、スルフヒドリル基をもつポリマーはHAの高膨潤性混合架橋ゲルを得るのに使用できる。

発明者らはまたさらにHAを上記の反応性の基をもつ低分子量物質の存在下で架橋反応を行なわせることによって有用な生成物がたやすく得られることを見出した。この発明によるもうひとつのタイプの物質はワセリンのような炭化水素；みつろう、ココナツオイル、ラノリンのような油または脂肪；カオリン、酸化第二鉄のような顔料、不溶性染料；ポリエチレン、ポリテトラフルオロエチレン等のようなポリマーなどいろいろな水に不溶性物質で満たされた架橋親水性ゲルである。この型の製品中には、微粒子の充填材がゲル網目構造または発明者らが“ポリマー籠（polymer cage）”と呼んでいるものの中に固定されている。この後者の製品はいくつかの目的に対して非常に有用なもので、以下に詳述する。

架橋ヒアルロン酸ゲルを得るには、何れかの原料からのヒアルロン酸またはその塩を希アルカリ水溶液に溶解する。HAの分子量は50,000～ $8 \times 10^6$ もしくはそれ以上であってよい。分子量は反応に影響する。すなわち分子量が高くなればなる程、架橋ゲルは生成しやすい。反応混合物におけるアルカリ濃度は0.005M～0.5Mもしくはそれ以上である。この下限は、媒体のpHが9より低くならないことが必要であることから規制され、上限はアルカリ溶液中のHAが加水分解されないように規制される。通常アルカリ濃度が小さくなると膨潤率の大きなゲルが生成するが、これはおそらくDVSの少量が架橋反応に使われるからであろう。

出発溶液中のHAの濃度は1～8重量%またはそれ以上にいろいろ変えることができる。濃度が1重量%以下であればいくらHA／DVS比が小さくても架橋ゲルは得られない。またこの濃度が高すぎると溶液の粘度が高くなりすぎ扱いにくくなる。HA濃度はゲルの膨潤挙動に大きく影響を与える（第1図）。膨潤率－HA濃度依存性曲線の形は種々のHA／DVS比に対して本質的に同一であるが、このHA／DVS比が小さくなればなる程、すなわち反応混合物にDVSがより多量あるとき、出発混合物中のHAの濃度が同じ溶液であっても架橋ゲルの膨潤率は低くなることを見い出された。

本発明者らは反応混合物中のHA／DVS比がまた別のパラメータであることを見出した。つまりHA／DVS比は、HAの架橋ゲルの膨潤率を制御するのに簡便に使うことができるということである。この比率が増加すれば高度に膨潤したやわらかなゲルが生成し（膨潤率は約4,000またはそれ以上）、一方この比率が減少すれば膨潤率の小さいかたいゲルが得られる。一般にHA／DVSの重量比は15：1～1：5またはそれ以下が好ましい。

架橋反応は通常室温すなわち約20℃で行なわれる。しか

し所望によりこの温度以下でも以上でも実施できる。しかし次のことに留意すべきである。すなわちHAはアルカリ水溶液において、高温では比較的急速に分解することがあり、かような分解が起こると、分子量が低下して得られるゲルの特性に影響を与えるときがある。

この架橋反応は比較的高速であり、したがってHA濃度が十分に大きく、HA/DVS比が小さいとき通常数分後には強固なゲルが形成される。しかし反応混合物におけるHA濃度が低くてもゲル形成はDVS添加後通常5~10分で開始される。本発明者らはたいいていの場合架橋反応が完了するには一時間あれば十分であることを見出した。

HAの架橋ゲルの膨潤率を制御するもう1つの方法として、反応混合物に中性塩を加えることが挙げられる。本発明者らは、アルカリ金属の塩化物、硫酸塩、リン酸塩、酢酸塩のような水に可溶性の中性塩の存在下で得られるゲルの膨潤率は、その塩の濃度が増加するにつれて減少することを発見した。塩は、その性質や反応混合物中のHA溶解度に及ぼす効果に依存するが、20重量%濃度までの、またはそれ以上の濃度で用いることができる。他の親水性ポリマー類の架橋ゲルを得るのに、HAに対するのと同じ反応条件を用いることができる。これらのゲルの膨潤率は、そのゲル構造中にHAを結合させることにより簡便に制御できる。この混合ゲルを製造する場合、そのポリマー混合物の組成は所望の架橋ゲルの膨潤率によって広範囲に変化させることができる。反応混合物のHAの好ましい含有率は5~95重量%である。

不活性物質を充填したHA、もしくは他のポリマーの架橋ゲル、または混合架橋ゲルは、DVSを添加する前に反応混合物の中に不活性物質を混合させることにより得られる。これらの不活性物質は水に不溶性の液体または固体が好ましい。これらの物質の例としてはワセリンやカオリンがある。この充填された架橋ゲルを得るためには、選択された不活性物質（ゲルの所望の特性を考慮して選択されるのであるが）を、HAもしくは他ポリマー、またはHAと他のひとつもしくは複数のポリマーとの混合物をアルカリ溶液に乳化または懸濁させ、次いでDVSがその混合物に加えられる。DVSの量と反応の他のパラメータは、ゲルの要求される特性に応じて選択される。ゲル中の充填材の比率は広範囲にわたって変えることができ、ポリマーと充填材との合計重量から計算して1~95重量%であり、5~90重量%が好ましい。

医薬、染料、および巨大分子網目構造に共有結合できる他の物質のごとき低分子量物質を含む架橋ゲルは好ましくはDVSを添加する前にHA溶液またはHAと他のポリマーとの混合溶液に上記物質を加えることによって得られる。上記物質の1つの例としては食品や医薬製剤の用途用にFDAが認可した物質のカルミン酸があげられる。

DVSとの架橋反応に関与するのはおそらく、カルミン

酸分子のグルコシド成分であろう。この型の改質架橋ゲルを得るために非常にたくさんの物質が適用できることを理解すべきである。これらの物質のひとつの特徴は、DVSに対し反応性の活性水素原子をもつ化学基を有していることである。反応に使用されるこれら低分子量物質の量は、ゲル中でのその物質の所望レベルに左右される。この量は、ゲル中に含まれるポリマー含量に基づいて、その1~99重量%の範囲であってもよく、好ましくは5~90重量%である。

本発明により得られる混合架橋ゲルには多くの用途がある。本発明者らはこれらの高度に膨潤したゲルが化粧品・製剤に非常に有用であり、これらの製剤における水分保持成分、または水分分配成分として考えられることを見出した。

HAは、人体に導入されたとき免疫や他の反応を起こさない意味で生理学的に認容しうるポリマーとして知られているので、架橋HAゲルはいろいろな医薬用途に使用できる。他のポリマーまたは低分子量物質によって改質された架橋HAゲルは医薬分配物質として使用できうる。たとえば発見者らは架橋HA中に導入されたヘパリンはその抗プロトロンビン活性を維持していることを見出した。本発明者らは、HAの架橋ゲルは、その中に分散させた低分子量物質の放出を遅らせるが、そのゲルの巨大分子マトリックスとは共有結合しないことを見出した。

架橋ヒアルロン酸（HA単独ポリマー又は他のポリ陰イオン系もしくは中性のポリマーとの共重合体）の構造は、分子籠（molecular cage）を形成する。この籠内にはいろいろな薬学的又は生理学的に活性な親水性又は疎水性の分子を分散させることができる。かくのごとくこの籠は、いろいろな大きさのこれらの物質の貯蔵庫を構成する。この分子籠内に保持された物質は拡散により籠外へ放出される。この放出過程は、排除体積効果や分子籠の細孔の大きさなどの要因及びポリマーの網目構造とそこに保持された物質との分子間相互作用により制御される。かくのごとくこの分子籠は、医薬や他の物質を皮膚や他の組成へ制御して分配するための貯蔵庫を形成する。

また架橋HAゲルにはもうひとつの特性があり、これによってこのゲルは医薬分配機構として極めて有用になると考えられる。これらのゲルの水中での膨潤率は溶媒中の塩濃度に大きく依存し、塩濃度が増加するに伴い、数倍減少する。このことは水中で膨潤するゲルは体内に導入されれば大きく縮み（体液や組織には正塩が含有されているため）、その結果、そのゲル内保持物、たとえば混入された医薬が体内組織へ分配されることを意味する。

種々の物質を充填した架橋ゲルは化粧品製剤にも使用できる。たとえばワセリンを入れたゲルを化粧品製剤に使用すると、ワセリン含有製剤に通常見うけられる不快なべと

ついた感触がないという利点がある。

## (ニ) 実施例

本発明を以下の実施例によってさらに詳しく説明する。ここで、特別に断わらないかぎり、与えられる量は重量単位である。なおこの発明の特許請求の範囲は以下の実施例により限定されるものではない。

### 参考例 1

この参考例ではHAの分子量をいろいろ変化させたときの架橋反応に及ぼす影響について示してある。

雄鶏のときかから得られたヒアルロン酸ナトリウム (0.15Mの食塩溶液の固有粘度 $[\eta]$  3859、分子量約 $2.5 \times 10^6$ ) 0.3410gを0.2Mの水酸化ナトリウム水溶液8.1840gと混合し、30分間攪拌して4重量%濃度の溶液とした。その後その溶液に攪拌しながらDVS 0.0721g加えた。HA/DVSの重量比は約4.7であった。約15分後には強固なゲルが形成された。このゲルは1時間放置した後蒸留水1ℓ中にうつされ、一晩中放置して膨潤させた。その後水中ではげしく攪拌してゲルを小さくくだけ、それを口過し次いで数回水洗し、無色透明の粒子が得られた。このゲルの膨潤率を測定するために、約1gの試料にガラスフィルターを用いて約2時間3,000rpmの速さで遠心分離機にかけた。次いでフィルター上に残った粒子を、1Nの硫酸2mℓで3時間、95~98℃で加水分解した。得られた透明の溶液を冷却し、1Nの水酸化ナトリウム水溶液で中和した後、グルクロン酸含有量がカルバゾール法〔ヘクスロン酸類の自動定量法、アナリティカル・バイオケミストリ (Analytical Biochemistry)、2517-558 [1965]〕で測定された。最初に生成した前記ゲルのHA含有量を計算した。その膨潤率を $100/[HA]\%$ として表わした。ここで $[HA]\%$ とは膨潤ゲル中のHAの重量%である。得られたゲルの水中での膨潤率は820であった。

次に、HAのアルカリ溶液を24時間室温に保持する点を除いては上記と同様の試験を繰返した。

これは、HA加水分解に付するものである。ポリマーの固有粘度 $[\eta]$ が1064で約 $0.5 \times 10^6$ の分子量に相当する。上記で用いたHA/DVS比では、このポリマーから架橋ゲルは得られなかった。

上記の分解したHAを用い、HA/DVS比を約2にして試験を繰返した。この結果水中での膨潤率が2910の架橋ゲルが得られた。

### 参考例 2

この参考例はアルカリ濃度のHAの架橋反応に及ぼす影響について示してある。

分子量約 $3 \times 10^6$ のHAの試料を0.2M水酸化ナトリウム水溶液の計算量に溶解し、4重量%濃度の粘性溶液を得、これにHA/DVS比が約5:1になる量のDVSを加えた。その後参考例1と同様にして架橋と処理を行なった。水中における膨潤率が990である架橋ゲルが得られた。

次にアルカリ濃度を0.01Mとして試験を繰返した。水中での膨潤率が3640のゲルが得られた。このように反応混合物中のアルカリ濃度が減少すれば、水中における膨潤率が著しく大きいゲルが生成する。

### 参考例 3

この参考例は、出発混合物中におけるHA濃度の変化が、得られるゲルの膨潤挙動に及ぼす影響について示してある。

0.2M水酸化ナトリウム水溶液中のHAナトリウム濃度がそれぞれ2.0, 2.0, 3.0, 3.5, 4.0, 5.5, 8.0及び10.0重量%であるヒアルロン酸ナトリウム溶液を8種類調製した。それぞれの溶液に計算機のDVSをHA/DVS重量比が約1 (モル比で約0.33) になるように加えた。架橋ゲルが上記参考例と同様に得られ、次いで処理した。膨潤率がそれぞれの試料について測定され、出発のHA濃度に対してプロットした。結果を第1図に示す。

### 参考例 4

この参考例は、いろいろなHA/DVS比が、得られるゲルの膨潤率に及ぼす影響について示してある。

0.2M水酸化ナトリウム水溶液を用いて4.0重量%濃度のヒアルロン酸ナトリウム溶液を6つ調製し、それぞれの溶液にHA/DVS比が0.2, 0.3, 0.5, 1.0, 1.5及び2.0mol/molになるように計算量のDVS量を加えた。架橋ゲルが得られ、得られたゲルは先の参考例で述べたのと同様の方法で処理された。それぞれの試料について膨潤率を測定し、混合物中のHA/DVS比に対してプロットした。その結果を第2図に示す。

### 参考例 5

この参考例は反応混合物に添加した塩化ナトリウムが、架橋ゲルの膨潤率に及ぼす影響について示してある。

上記方法に従って2つのHA架橋ゲル試料を調製した。0.2M水酸化ナトリウム水溶液中のヒアルロン酸ナトリウムの濃度は、4重量%であった。HA/DVS比は約5:1、反応時間は1時間であった。2番目の反応混合物に、塩濃度が1.0モル濃度になる量で塩化ナトリウムを加えた。一番目のゲルの膨潤率は2380であり、一方無機塩を添加して得られたゲルの水中での膨潤率は650であった。

### 参考例 6

この参考例は、ヒドロキシエチルセルロースのDVSを使用した場合の架橋反応について示してある。

風乾したヒドロキシエチルセルロース〔セロサイズ (Cellosize) QP-100000 (登録商標)、ニュオンカーバイド (Union Carbide) 社製〕0.4312gを、0.2N水酸化ナトリウム水溶液10.3gに攪拌しながら溶解し、4重量%濃度の溶液とした。この溶液にDVS 0.0855g (ポリマー/DVSの重量比約5:1) を攪拌しながら加え、混合物を1時間室温で放置した。その後参考例1と同様の処理をして架橋ゲルを得た。このゲルの中のポリマー濃度と膨潤率とを測定するため、このゲルから試料

分を秤取し、アセトン中に入れ、1夜放置し、その後アセトンで数回洗浄した後一定重量になるまで50℃で減圧乾燥した。この得られたゲルの膨潤率は43であり、同じ条件下で得られるHAの架橋ゲルのそれよりもはるかに小さい値である。

#### 参考例7

この参考例はDVSを使用したキサンテンゴムの架橋反応について示してある。

風乾したキサンテンゴム〔ケルザン (Kelzan、登録商標)、ケルコ (Kelco) 社製〕0.4935gを0.2Mの水酸化ナトリウム水溶液11.3gに溶解し、4重量%濃度の溶液を得た。この溶液に0.0718gのDVS (ポリマー/DVS重量比が約7:1)を加えた。反応混合物を室温で1時間放置した。最終的に得られた架橋ゲルを大量の水の中にうつし、一夜放置して膨潤させた。その後細かくくだき、丹念に水洗した。上記参考例に記載した、重量法によりゲルの膨潤率を測定したところ526であった。これは同じ条件下で得られたHAの架橋ゲルのそれよりもはるかに小さい値である。

#### 参考例8

この参考例は陽イオン性の水溶性セルロースポリマーにDVSを使用した架橋反応について示してある。

得られる陽イオン性セルロースポリマー〔ポリマーユーケアジェイアール (polymer Ucare JR、商標登録)、ユニオンカーバイド社製〕0.5483gを0.2Mの水酸化ナトリウム水溶液13.71g中に溶解して4重量%濃度の溶液とし、これにDVS 0.0849g (ポリマー/DVS比が約6.5:1)を加えた。反応混合物を室温で1時間放置した後、得られたゲルを前述のように処理して分析した結果、水中でのゲル膨潤率が386であった。これは同じ条件下で得られるHAの架橋ゲルのそれより著しく小さい値である。

#### 参考例9

この参考例は、DVSを使用したカルボキシメチルセルロースの架橋反応について示してある。

カルボキシメチルセルロースのナトリウム塩〔9H4H、ハーキュルス (Hercules) 社製〕0.4703gを0.2Mの水酸化ナトリウム水溶液11.76g中に溶解させ、4重量%の溶液とし、これにDVS 0.0651g (ポリマー/DVS比が約7:1)を加えた。反応混合物を室温で1時間放置し、得られたゲルを上記参考例と同様に処理し分析した。このゲルの水中での膨潤率は893であった。これは他のセルロース系ポリマーより得られたものと比べて大きい値であるがしかし、HAの架橋ゲルに比べると小さい値である。

#### 実施例1~4

これらの実施例は、HAとカルボキシメチルセルロースとで作った混合架橋ゲルとその中のHAの濃度がゲル全体の膨潤率に及ぼす影響について示す。

各実施例において、ヒアルロン酸ナトリウムとカルボキ

シメチルセルロース9H4Hとを両者を特定の比で秤取し、0.2Mの水酸化ナトリウム水溶液に溶解した。いずれの場合も合計ポリマー濃度が4重量%であり、ポリマー/DVS比が約5:1であった。上記参考例と同様の方法でゲルを作製して処理した。ゲル中のポリマー含量は、加水分解物中のヘキシサミンの濃度を(グルクロン酸のかわりに)公知の方法〔微量分析におけるアミノ糖類の迅速定量法、アナリティカル・バイオケミストリ (Analytical Biochemistry) 15, 167-171 [1966]〕で測定されたこと以外参考例1と同様にしてゲル中のポリマーの濃度が測定された。ポリマー含量はHAの濃度と2つのポリマーの比率とから計算された。

実施例番号	出発混合物のHA含量 (単位: 重量%)	水中での膨潤率
1	70	8196
2	50	6757
3	20	1117
4	0	623

20 上記データから明らかなように出発混合物中のHA含量が増加すると生成したゲルの膨潤率が増加する。

#### 実施例5

この実施例はHAとコラーゲンとから得られた混合架橋ゲルについて示してある。

0.1Mの水酸化ナトリウム水溶液2.5ml中に溶解させた。一方、ヒトのへその緒から得られたコラーゲン0.063gを0.1M酢酸溶液2.3ml中に溶解させ、両溶液を混合した。合計ポリマー濃度は6重量%濃度であり、HA/コラーゲンの重量比は約4:1であった。この混合溶液中に乾燥したKC10.05gを溶解させ、DVSを、ポリマー/DVSの重量比が約5:1の割合になる量で反応混合物に加え攪拌した。反応混合物を室温で1時間放置し、得られたゲルは上記実施例と同様の方法で処理された。膨潤ゲル中のポリマー含量はグルクロン酸分析法によって測定されるHA含量から計算された。強固な、弾力性のあるゲルが得られ、その水中での膨潤率は321であった。

#### 実施例6

40 この実施例は、実施例5に記載のゲルよりもコラーゲン含量が多くかつ膨潤率の低いHA-コラーゲンの混合架橋ゲルについて示してある。

ヒアルロン酸ナトリウム0.2544gを、0.2M水酸化ナトリウム水溶液3.5ml中に溶解させた。一方ヒトのへその緒から得られたコラーゲン0.1192gを0.2M酢酸溶液1.5ml中に溶解させ、両溶液を混合した。全ポリマー濃度は7.5重量%であり、HA/コラーゲンの重量比は約2:1であった。この混合溶液に塩化ナトリウム0.05gを溶かし、さらにDVS 0.1189gを加えた。このときポリマー/DVS比は重量比で約3:1であった。ゲルが生成し上述の実施例と同様の処理をした結果、膨潤率



35の強固なゲルが得られた。

#### 実施例7

この実施例は、HAとヘパリンとの混合架橋ゲルについて示してある。

乾燥したヒアルロン酸ナトリウム0.2968gを0.2Mの水酸化ナトリウム水溶液6.92g中に溶解させ、4重量%濃度の溶液とし、これにヘパリン0.0503gを加えた。このとき全ポリマー量に基づいて計算されたヘパリン含量は、14.5重量%であった。この反応混合物にDVS0.0590gを混合物に攪拌しながら加えた。この反応は室温で1時間行なわれた。得られたゲルは上記実施例と同様に処理され、そのゲルの膨潤率は625であった。

#### 参考例10

この参考例はワセリンを充填したヒドロキシエチルセルロースの架橋ゲルについて示してある。

乾燥したヒドロキシエチルセルロース0.5292gを1Mの水酸化ナトリウム水溶液10.58gに溶解させ、その溶液に白色のワセリン1.058gを攪拌しながら加えた。ワセリン／ポリマーの重量比は約2であった。DVS0.1771gを1Mの水酸化ナトリウム水溶液1.0gに加えた溶液を激しく攪拌しながら上記乳濁液に加えた。反応混合物を室温で1時間放置した後、得られたゲルは上記実施例と同様に処理された。ゲル中のワセリン含量を調べるためにゲル試料を1N硫酸2mℓ中に3時間95℃で浸漬した。その後この反応混合物に1N水酸化ナトリウム水溶液2mℓを加えた後、キシレン4mℓでワセリンを抽出した。抽出液を減圧蒸発し、残留物の重量を測定した。ゲル中の計算ワセリン含量は6重量%であった。

#### 実施例8

この実施例はワセリンを充填したHA-カルボキシメチルセルロースの混合架橋ゲルについて示してある。

乾燥したヒアルロン酸ナトリウム0.1830gと、同量のカルボキシメチルセルロースとを0.2Nの水酸化ナトリウム水溶液9.1g中に溶解し、4重量%のポリマー溶液とした。この溶液にワセリン0.3660gを攪拌しながら加え得られた乳濁液にDVS0.0730gをはげしく攪拌しながら加えた。ポリマー／DVS比は約5：1であった。反応混合物を1時間室温で放置した後、得られたゲルは前述の実施例と同様の処理をした。ヘキソサミン含量より測定されたゲルの膨潤率は738であり、前記実施例と同様にして定量されたワセリン含量は0.1重量%であった。

#### 参考例11

この参考例は、カオリンを充填したHAの架橋ゲルについて示してある。

乾燥したヒアルロン酸ナトリウム0.2700gを0.2N水酸化ナトリウム水溶液に溶解して4重量%のポリマー溶液とした。その溶液にカオリン0.5400gを攪拌しながら加えた。得られた懸濁液にDVS0.5400gを加え、反応混合物を室温で1時間放置した。生成したゲルを多量の水にうつし、膨潤させた。その高膨潤ゲルを針つきの注射器

から押し出して小さな粒状にくだいた。粒状物は丹念に水で洗われた。乳白色の高膨潤度の粒状物が得られた。ゲル中の固体成分の含量は0.064重量%であった。

#### 参考例12

この参考例は巨大分子網目構造に共有結合したカルミン酸を含むHAの架橋ゲルについて示してある。

乾燥したヒアルロン酸ナトリウム0.20gと、カルミン酸0.040gを0.2M水酸化ナトリウム水溶液5.0mℓ中に溶解し、約4重量%のポリマー溶液とした。次にこの溶液にDVS0.40g（ポリマー／DVS比が1：2）を加えた後反応混合物を室温の処理をした。

赤色透明なゲル粒状物が得られ、丹念に水洗しても色は消えなかった。重量分析法により測定された水中での膨潤率は115であった。

#### 参考例13

この参考例はHA架橋ゲルの膨潤挙動に及ぼす水中の塩濃度の影響について示してある。

0.2M水酸化ナトリウム水溶液中のHA濃度が4重量%、HA／DVS比が5：1で1時間室温で放置して前記実施例と同様にしてひとつの架橋HAゲルを得た。ゲル粒状物を水と、異なった塩化ナトリウム濃度の水溶液に入れて膨潤率を測定し、以下に示す結果を得た。

NaCl 濃度、M	膨潤率
水	990
0.05	413
0.15	384
0.50	219
1.00	179

#### 実施例9

この実施例はHA-ヘパリン混合架橋ゲルの生物活性を示す。

実施例7に従って調製されたHA-ヘパリン混合架橋ゲルの微粒子を架橋HAの濃度が0.01、0.02及び0.04重量%になる量で、正常なヒトの血漿に混合したところ、これらの試料の凝固時間はそれぞれ1.4、2.8、及び5.0倍に増加した。ヘパリンを含まない架橋ゲル粒状物の同じ濃度のものは凝固時間に影響を与えなかった。

これらのデータは、ヘパリンが架橋ゲル構造中に混入されてもトロンビンで触媒されるフィブリン形成を阻害する能力を失わないことを示している。

#### 参考例14

この参考例はHA架橋ゲル粒状物を含んだ製品が、化粧品製剤として有用であることを示す。

次に示す反応条件下で参考例1と同様の方法によりHAの架橋ゲルを調製した。すなわち、0.2M水酸化ナトリウム水溶液中のHA濃度が3.0重量%、HA／DVS比が約3：1及び室温で1時間である。ゲルは多量の水中に一夜放置され膨潤させられた。その後18-1/2ゲージの針付注射器より押しだして小さな粒状にくだき、さらに25-1/2ゲージの針付注射器より押し出してくだ

いた。粒状物は徹底的に水洗された。無色透明の粒状物が得られた。そのゲルの膨潤率は1980であった。口過されたゲル粒状物中のHA濃度は0.025重量%であった。これらの粒状物は、高分子量のポリエチレンオキサイド〔ポリオックス (Polyox, 登録商標)、コーギュラント (Coagulant)、ユニオンカーバイド社製〕と水溶性ヒアルロン酸ナトリウム〔ヒラダーム (Hyladerm, 登録商標)、バイオマトリックス インコーポレーション (Biomatrix, Inc.) 製〕との下記組成の混合物に用いられた。

成分	混合物1	混合物2	混合物3
架橋ゲル	90	80	75
ヒラダーム(登録商標) (ヒアルロン酸ナトリウムの1%水溶液)	5	2	14
ポリオックス(登録商標)1%水溶液	5	4	11
水	-	14	-

これらすべての配合物は成分の性質が異なっているにもかかわらず外観は均一な粘性液体であった。皮膚に塗布すると、それらは非常にしっとりとしたすべすべした感触を与える。

#### 参考例15

この参考例は本発明によるHAの架橋ゲルを含んだモイスタライジング・アイスクリーム (moisturizing eye cream) を示す。

	重量%
A. カーボポール (Carbopol, 登録商標) 940 [B. F. グッドリッチ (Good rich) 社製]	0.4
混合物#3 (実施例23)	10.0
水	83.3
B. ボルボ (Volpo, 登録商標) - 3 (クロダインコーポレーション製)	1.0
ボルボ (Volpo, 登録商標) - 5 (クロダインコーポレーション製)	0.5
ソルラン (Solulan, 登録商標) C-24 [アマコールシーオー (Amerchol Co.) 製]	1.8
ローバン (Roban, 登録商標)	1.0
クロダモール (Crodamol, 登録商標) PMP (クロダインコーポレーション製)	0.5
グルカム (Glucam, 登録商標) E-10 (アマコールシーオー製)	0.7
防腐剤	0.3
C. トリエタノールアミン	0.4
香料	0.1

この配合物は次に示すように段階的に調製される。パー

トAの混合物は、水にカーボポールを分散させて調製され、次いで他の成分に加えて攪拌される。パートBの成分はすべて一緒に混合し70℃に加熱した。パートA調製物とパートB調製物とを和し、次いでトリエタノールアミンと香料を加えた。出来上がったクリームは安定であり、なめらかであった。そして良好な湿分付与性能を有し、皮膚にすぐれた感触を与えた。

#### 実施例10

この実施例は、架橋ゲルにワセリンを充填したものをハンドローションに用いた実施例を示す。

	重量%
A. カーボポール (登録商標)	0.25
カルボキシメチルセルロース 9H 4F, の1%水溶液	2.00
実施例18の製品	60.00
水	36.70
B. ロバーン (Robane, 登録商標)	0.20
コッキン (Cochin, 登録商標)	0.10
防腐剤	0.30
C. トリエノールアミン	0.25
香料	0.20

この配合物は上記実施例に記載した同様の方法で調製された。出来上がったローションはきわめて湿潤性に富んでおり肌につけた際べとつきが感じられなかった。

参考例15と実施例に登録商標で示された成分は下記のとおりである。

ボルボ (登録商標) - 5	オレス-5 (Oleth-5、オレイルアルコールのポリエチレングリコールエーテル)
30 ボルボ (登録商標) - 3	オレス-3 (Oleth-3、オレイルアルコールのポリエチレングリコールエーテル)
ソルラン (登録商標) コレス-24 (Choleth-24、C-24	コレステロールのポリエチレングリコールエーテル)
クロダモール (登録商標) PMP	(プロボキシ化したミリスチルプロピオネート) PPG-3 ミリスチルエーテルプロピオネート
40 グルカム (登録商標) E-10	メチルグルセス-10 (Methyl gluceth-10、メチルグルコースのポリエチレングリコールエーテル)

#### 参考例16

この参考例は架橋ヒアルロン酸のマトリックス中に分散された低分子量物質の緩徐な離散現象について示してある。

この実験では、放射性同位元素でラベルされた物質 (以下ラベル物質と略す)、すなわちヒドロキシトリプタミンビノキシレート、5-[1,2-3H(N)]-、が使



用された。この物質の40 $\mu$ Mの2つの5 $\mu$ l溶液に、H Aの架橋ゲル粒状物（ゲル中のH A濃度が0.131%）5 $\mu$ l及び水5 $\mu$ lとをそれぞれ混合した。この両混合物を別々の透析管にうつし0.15M塩化ナトリウム水溶液中で24時間透析した。架橋ゲルとラベル物質との混合物の方には、ラベル物質の出発量のうちの54%が透析管内に残っていた。しかし一方水にラベル物質を混ぜた方ではわずか10%しか残っていなかった。このことはH Aの架橋ゲルは低分子量物質の離散速度を5倍以上も遅延させることを如実にあらわしている。

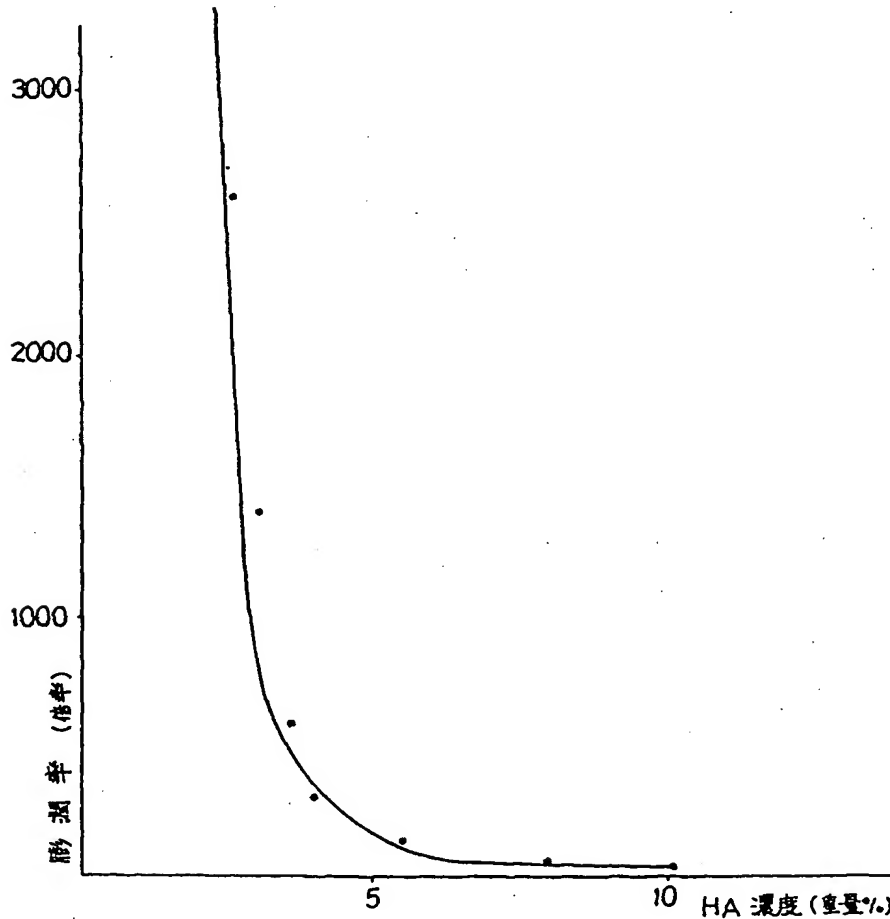
もちろんこの発明は、この発明の思想及び範囲からはずれることなしに変化させることができる。

【図面の簡単な説明】

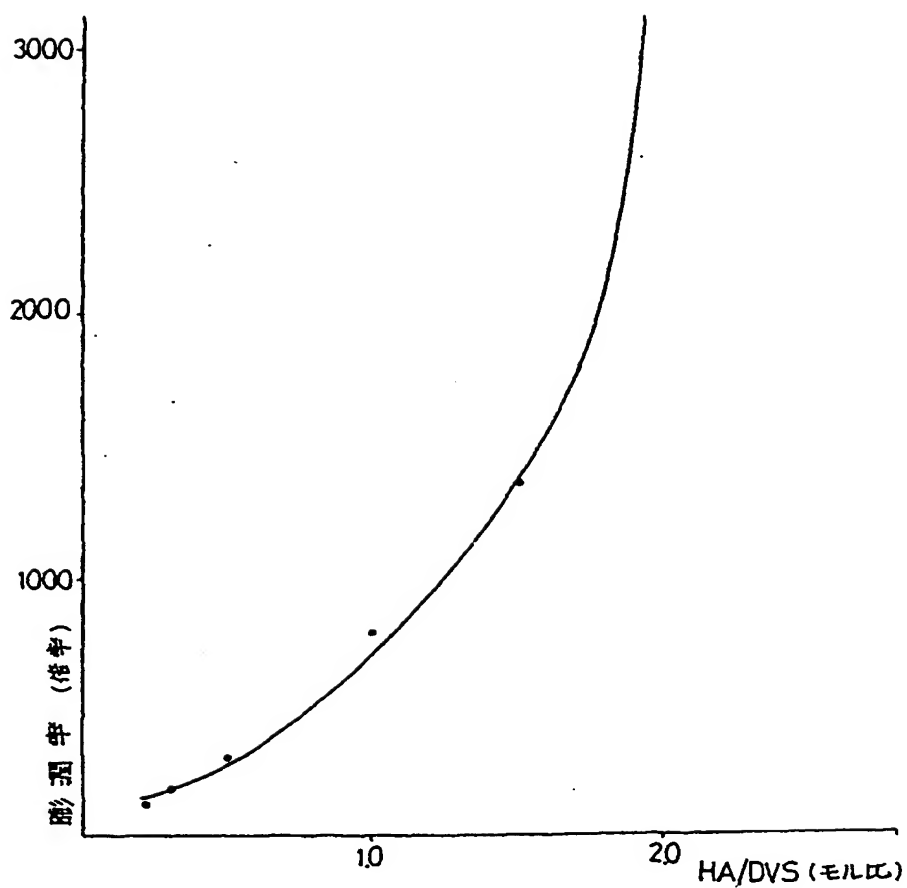
第1図は参考例3で述べた、出発溶液中におけるH Aのいろいろな濃度に対して、H A/DVSの重量比が約1で室温下1時間反応させて得られるゲルの膨潤率を示すグラフ、第2図は参考例4で述べた、H A/DVSのいろいろなモル比に対して出発溶液中のH A濃度が4重量パーセントで室温下1時間反応させて得られるゲルの膨潤率を示すグラフである。

10

【第1図】



【第2図】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>5</sup>

A 6 1 K 31/725

C 0 8 B 37/08

C 0 9 K 3/00

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

8314-4C

Z 7329-4C

1 0 3 B 8517-4H

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**